Directions for use

INTENDED USE
Phadebas® Amylase Test is a method for the quantitative assay of α-amylase in fluids.

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE
The substrate is a water-insoluble, cross-linked starch polymer carrying a blue dye. The substrate is hydrolysed by α-amylase to form water-soluble blue fragments. The absorbance of the blue solution is a function of the α-amylase activity in the sample.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING
- Avoid contamination with detergents, which may alter amylase activity, by using well rinsed glassware or disposable plastic equipment.
- Special care must be taken to avoid contamination with saliva or sweat, which contain large amounts of α-amylase.
- Avoid anticoagulants which bind calcium ions (Ca^{2+}). Citrate, fluoride, and EDTA should not be used.
- When analysing very turbid samples, measure the absorbance against a sample blank. The procedure for the sample blank is the same as for normal samples, except that the sample is added after the addition of NaOH.
- Amylase activity in serum samples is stable for one week at controlled room temperature, but good practice dictates that serum samples be stored at 2–8°C. For longer periods the sample must be stored at –20°C.
- It is recommended that determination of α-amylase from urine samples is performed on the same day as the specimen is voided. Although the majority of urine samples are stable at 2–8°C for one week, deteriortiation has been known to occur.
  24 hour urine collection should be avoided.

MATERIAL PROVIDED, KIT CONTENTS
Phadebas Amylase Test (50) – one bottle of 50 tablets or Phadebas Amylase Test (500) – five bottles of 100 tablets (each tablet contains 45 mg blue starch)
Package insert
Standard curve

LABORATORY EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

	Number	Size
Automatic pipette or dispenser	1	4.0 ml
Automatic pipette or dispenser	1	1.0 ml
Micropipettes with disposable plastic tips	1 each	200 µl
Plastic centrifuge tubes		10–12 ml

Pasteur pipettes or equivalent
Water bath at 37°C ± 0.5°C with good circulation
Stop watch or timer
Centrifuge capable of producing 1500 g, or filtration equipment
Photometer measuring at 620 ± 5 nm
Vortex mixer
Distilled water
Sodium hydroxide (NaOH) solution, 0.5 M

PARAMETERS OF THE METHOD

Sample volume:	200 µl
Volume of final reaction mixture	5.2 ml
Incubation time and temp.	15 min / 37°C

For samples with high α-amylase activities, decrease incubation time to 5 minutes and multiply the activity reading from the standard curve by 3 (three).

SHELF LIFE AND STORAGE
Keep dry and store at controlled room temperature. After unsealing, store bottles closed, and retain dessicant. The expiry date is stated on the outer label.
N.B. Do not contaminate samples, tablets, or equipment with saliva or sweat.

TEST PROCEDURE
Note that these instructions must be followed in every detail or the standard curve applied is not valid.
1. Pipette 200 µl of sample into 10–12 ml centrifuge tubes.
2. Add 4.0 ml of distilled water. A distilled water blank of 4.2 ml should also undergo the entire procedure.
3. Pre-incubate the tubes for 5 minutes at 37°C in water bath.
4. Add one tablet to each tube – use forceps – immediately vortex for 10 seconds and replace in water bath. For serial assays add tablets at exactly 15 or 20 seconds intervals.
5. Incubate by standing the tubes in a well stirred water bath at 37 ± 0.5°C for exactly 15 minutes.
6. Stop the reaction exactly 15 minutes after tablet addition by adding 1.0 ml of 0.5 M sodium hydroxide. Vortex immediately.
7. Centrifuge at 1500 g for 5 minutes or filter. Pipette the blue supernatant/filtrate into a cuvette.
8. Measure the absorbance of the supernatant/filtrate at 620 nm against distilled water using a cuvette with 1 cm light path.
9. Subtract the absorbance value of the blank from that of the sample.
10. Make sure that the standard curve with the same Batch No. as that printed on the vial label is used. Read the α-amylase activity in U/l from the standard curve. This gives directly the α-amylase activity in the samples.

INSTRUCTIONS FOR MODIFIED PROCEDURES FOR DIFFERENT RANGES

Moderate α-amylase activities
The tablet composition and the test procedure have been designed to cover the widest possible range of α-amylase activity. Without any further steps it is possible to measure α-amylase activities from 35 U/l up to 1000 U/l, provided a photometer for measuring absorbances up to 2.0 is used.

High α-amylase activities
Do not measure absorbance above 2.0. Some photometers cannot measure accurately above an absorbance of 1.0–1.5. When absorbance exceeds the measuring capability of the photometer, dilute the supernatant 10-fold using distilled water. Multiply absorbance by 10, subtract the blank value, and read the amylase activity from the standard curve.

Very high α-amylase activities
If very high activities are to be measured, samples can be diluted up to 5-fold using distilled water. For further dilutions, use distilled water containing 0.9% NaCl, 0.2% bovine serum albumin (BSA), and 20 mM $CaCl_2$. Read the activity from the standard curve and multiply by the appropriate dilution factor.

CALIBRATION
In accordance with the recommendation drawn up by the commission on Clinical Enzyme Units of the International Union of Biochemistry, one unit (U) of amylase activity is defined as the amount of enzyme catalyzing the hydrolysis of 1 µmol glucosidic linkage per minute at 37°C. One microkatal (µkat or µmol/s) is equivalent to 1/60 of one U. Using the standard curve enclosed in the package, the absorbance values of test samples are converted to U/l.
As various methods for the determination of α-amylase activity use different substrates, a strict correlation between other units and U/l does not exist. However, approximate conversions from U/l to other units may be made.
For conversion to Somogyi units/100 ml: multiply by 0.54. For conversion to Street-Close units/100 ml: multiply by 0.164.

WARRANTY
Any change or modification in the procedure not recommended by Magle AB may affect the results, in which event Magle AB disclaims all warranties expressed, implied or statutory, including the implied warranty of merchantability and fitness for use.
Magle AB and its authorized distributors, in such event, shall not be liable for damages indirect or consequential.

Revised December 2006

Gebrauchsinformation

ANWENDUNGSBEREICH
Der Phadebas® Amylase Test ist eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung der α-Amylase-Aktivität in Flüssigkeiten.

TESTPRINZIP
Das Substrat ist ein blau gefärbtes, durch Quervernetzung wasserunlösliches Stärkepolymer. Das Stärkepolymer wird unter Einwirkung von α-Amylase zu blauen wasserlöslichen Fragmenten hydrolysiert. Die Absorption der Farblösung ist dabei direkt von der Aktivität der α-Amylase in der Probe abhängig.

PROBENAHME UND PROBENHANDHABUNG
- Reinigungsmittelrückstände können die Amylase-Aktivität stark beeinflussen. Teströhrchen aus Glas müssen daher sorgfältig gespült oder durch Einwegröhrchen aus Kunststoff ersetzt werden.
- Speichel oder Schweiß enthalten hohe Amylase-Konzentrationen. Verunreinigungen durch derartige Körperflüssigkeiten müssen deshalb sorgfältigst vermieden werden.
- Gerinnungshem-mende Mittel, die Calcium-Ionen (Ca^{2+}) binden, sind nicht geeignet. Zitrat, Fluorid und EDTA dürfen nicht verwendet werden.
- Bei der Analyse von sehr trüben Proben erfolgt die Messung der Absorption gegen eine Blindprobe. Mit Ausnahme der Probeneinpipettierung erst nach der NaOH-Zugabe, unterscheidet sich die Handhabung von Blindproben nicht von jener normaler Proben.
- Bei konstanter Raumtemperatur bleibt die Amylase-Aktivität in Serumproben über einen Zeitraum von einer Woche stabil. Dennoch ist eine kühle Lagerung der Proben bei Temperaturen von 2 bis 8°C zu empfehlen. Lagerungszeiten über eine Woche erfordern die Aufbewahrung der Proben bei –20°C.
- Bestimmungen der α-Amylase-Werte von Urinproben sollten noch am Tag der Probenahme vorgenommen werden. Obwohl Urinproben bei Temperaturen von 2 bis 8°C für gewöhnlich eine Woche stabil bleiben, können Aktivitätsabnahmen nicht ausgeschlossen werden.
  Urinprobenahmen über einen Zeitraum von 24 Stunden sind zu vermeiden.

INHALT
Phadebas Amylase Test (50) – ein Fläschchen á 50 Tabletten oder Phadebas Amylase Test (500) – fünf Fläschchen á 100 Tabletten (jede Tablette enthält 45 mg Blaustärke)
Gebrauchsinformation
Standardkurve

ERFORDERLICHE LABORAUSSTATTUNG UND ANYLYSEKOMPONENTEN (NICHT INKLUDIERT)

	Anzahl	Größe
Automatik-Pipette oder Dosierer	1	4.0 ml
Automatik-Pipette oder Dosierer	1	1.0 ml
Mikropipetten mit Einwegspitzen aus Kunststoff	1	200 µl
Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff		10–12 ml

Pasteurpipette oder äquivalentes Saugröhrchen
Wasserbad (37°C ± 0.5°C) mit guten Zirkulationsvermögen
Stoppuhr oder Timer
Zentrifuge geeignet für 1500 g oder Filtriergerät
Photometer für die Messung bei 620 ± 5 nm
Vortex Mixer
Destilliertes Wasser
Sodiumhydroxid-(NaOH)-Lösung 0.5 M

TESTPARAMETER

Volumen der Probe:	200 µl
Volumen des Reaktionsprodukts	5.2 ml
Zeit/Temperatur der Inkubation	15 min/37°C

Bei Proben mit hoher α-Amylase-Aktivität ist die Inkubationszeit auf 5 Minuten zu reduzieren und der Aktivitätswert aus der Standardkurve mit 3 (drei) zu multiplizieren.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG
Die Testkomponenten sind trocken und bei konstanter Raumtemperatur aufzubewahren. Nach dem Öffnen müssen die Behältnisse wieder sorgfältig verschlossen und gemeinsam mit dem enthaltenen Trockenmittel gelagert werden. Das Haltbarkeitsdatum ist am Außenetikett angegeben.
NB: Verunreinigungen der Proben, Tabletten und Testkomponenten mit Speichel oder Schweiß sind sorgfältig zu vermeiden.

TESTVERFAHREN
Befolgen Sie die Anweisungen genau. Bei Nichtbefolgung der Instruktionen verliert die Standardkurve ihre Gültigkeit.
1. Pipettieren Sie 200 µl der Probe in die 10 bis 12 ml Zentrifugenröhrchen.
2. Fügen Sie 4.0 ml destilliertes Wasser hinzu. Parallel ist auf eine 4.2 ml Destillierwasser-Blindprobe ebenfalls der gesamte Verfahrensdurchgang anzuwenden.
3. Vorinkubieren Sie die Röhrchen für 5 Minuten im Wasserbad bei 37°C.
4. Geben Sie mit einer Pinzette jeweils eine Tablette in jedes Teströhrchen und beginnen Sie sofort für 10 Sekunden zu vortexen. Tauchen Sie die Teströhrchen anschließend in das Wasserbad. Für Serienuntersuchungen erfolgt die Tablettenzugabe in exakten Intervallen von 15 bis 20 Sekunden.
5. Inkubieren Sie die Teströhrchen für genau 15 Minuten im gut durchmischten Wasserbad bei 37 ± 0.5°C.
6. Beenden Sie die Reaktion exakt 15 Minuten nach der Tablettenzugabe durch die Beimengung von 1.0 ml 0.5 M Sodiumhydroxid. Beginnen Sie umgehend mit dem Vortexen.
7. Zentrifugieren Sie für 5 Minuten bei 1500 g oder verwenden Sie das Filtriergerät. Pipettieren sie anschließend den blauen Überstand bzw. das Filtrat in eine Küvette.
8. Messen Sie mit einer 1 cm Küvette die Absorption des Überstands bzw. des Filtrats bei 620 nm gegen das destillierte Wasser.
9. Subtrahieren Sie den Absorptionswert der Blindprobe vom Absorptionswert der Probe.
10. Überprüfen Sie, ob die Seriennummer der Standardkurve mit der auf dem Etikett angegebenen Nummer übereinstimmt. Lesen Sie den in U/l angegebenen α-Amylase-Aktivitätswert direkt aus der Standardkurve ab. Der Wert entspricht exakt der α-Amylase-Aktivität in den Proben.

MODIFIZIERTE VERFAHREN FÜR UNTERSCHIEDLICHE AKTIVITÄTSBEREICHE

Mäßige α-Amylase-Aktivität
Die Tablettenzusammensetzung und das Testverfahren wurden so konzipiert, dass ein möglichst großer Bereich unterschiedlicher α-Amylase-Aktivitäten erfasst werden kann. Unter Verwendung eines Photometers, welches die Messung von Absorptionswerten bis 2.0 erlaubt, können Amylase-Aktivitäten im Bereich von 35 U/l bis 1000 U/l direkt und ohne weitere Verfahrensschritte bestimmt werden.

Hohe α-Amylase-Aktivität
Absorptionsmessungen über 2.0 dürfen nicht vorgenommen werden. Einige Photometer liefern bei Absorptionsswerten über 1.0 bzw. 1.5 ungenaue oder fehlerhafte Messergebnisse. Wenn der erfassbare Messbereich des Photometers überschritten wird, ist der Überstand um das 10-fache mit destilliertem Wasser zu verdünnen. In diesem Fall ist die Absorption mit 10 zu multiplizieren und der Blindwert davon abzuziehen. Danach kann die Amylase-Aktivität aus der Standardkurve abgelesen werden.

Sehr hohe α-Amylase-Aktivität
Bei der Messung sehr hoher Aktivitätsraten können die Proben bis zum 5-fachen mit destilliertem Wasser verdünnt werden. Für weitere Verdünnungen ist destilliertes Wasser zu verwenden, das 0.9 % NaCl, 0.2 % Rinder-Serum-Albumin und 20 mM $CaCl_2$ enthält. Danach wird der Aktivitätswert aus der Standardkurve abgelesen und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

KALIBRIERTE MESSEINHEITEN
Gemäß den von der Kommission für „Clinical Enzyme Units" der „International Union of Biochemistry" festge-setzten Richtlinien entspricht eine Einheit (U) Amylase-Aktivität der Enzymmenge, die die Hydrolyse von 1 µmol glykosidischer Bindungen in 1 min bei 37°C katalysiert. Ein Mikrokatal (µkat oder µmol/s) entspricht 1/60 von 1 U (U/1:60). Jeder Testpackung ist eine Standardkurve beigelegt, mit deren Hilfe die Absorptionswerte der Proben direkt in U/l umgerechnet werden.
Da die verschiedenen Methoden zur Bestimmung der α-Amylase-Aktivität unterschiedliche Substrate heranziehen, ist eine exakte Übereinstimmung zwischen anderen Einheiten und der Einheit U/l nicht ge-geben. U/l-Angaben lassen sich jedoch anhand von Richtwerten in anderen Ein-heiten ausdrücken:
Somogyi-Einheiten/100 ml = 0.54 x U/l
Street-Close-Einheiten/100 ml = 0.164 x U/l

GEWÄHRLEISTUNG
Jede von Magle AB nicht empfohlene Änderung oder Modifikation des Verfahrensablaufs kann die Ergebnisse beeinflussen. In derartigen Fällen schließt Magle AB jegliche Gewährleistung, sowohl ausdrücklicher, stillschweigender als auch anderer Natur aus, einschließlich der Gewährleistung für Marktgängigkeit und Eignung für einen bestimmten Zweck.
Magle AB und seine Vertragspartner können weder für indirekte Schäden noch für Folge-schäden haftbar gemacht werden.

Stand Dezember 2006

Mode d'emploi

INDICATIONS D'EMPLOI

Le Phadebas® Amylase Test est une méthode de détermination quantitative de l'alpha-amylase dans les fluides.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Le substrat est un polymère d'amidon réticulé insoluble dans l'eau avec un colorant bleu. Le substrat est hydrolysé par l'alpha-amylase et crée des fragments bleus, solubles dans l'eau. L'absorbance de la solution est proportionnelle à l'activité de l'alpha-amylase dans l'échantillon.

PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

- Éviter la contamination par les détergents susceptibles d'altérer l'activité de l'alpha-amylase, en utilisant du matériel en verre rincé abondamment ou du matériel plastique à usage unique.
- Éviter particulièrement les contaminations par la salive ou la sueur, celles-ci contenant des quantités très importantes d'alpha-amylase.
- Éviter les anticoagulants complexant les ions calcium (Ca^{2+}). Ne pas utiliser de citrates, de fluorures ou d'EDTA.
- Lorsque la turbidité des échantillons est très importante, la D.O. est mesurée contre un échantillon « blanc » . Celui-ci est préparé comme un échantillon normal, sauf que l'on ajoute l'échantillon seulement après l'addition de soude.
- L'activité amylase est stable une semaine dans les échantillons sériques conservés à température ambiante, mais par principe, on conserve le sérum à 2–8°C. Pour une conservation sur de plus longues périodes, l'échantillon sera congelé (–20°C).
- Il est recommandé de déterminer le taux d'alpha-amylase dans des échantillons d'urine le jour même où ils sont collectés. Bien que la majorité des échantillons urinaires soient stables une semaine à 2–8°C, une dénaturation peut survenir.
  Il faut éviter les déterminations sur les urines de 24 heures.

CONTENU DE LA TROUSSE

Phadebas Amylase Test 50 : 1 flacon de 50 comprimés
Phadebas Amylase Test 500 : 5 flacons de 100 comprimés (chaque comprimé contient 45 mg d'amidon bleu)
Mode d'emploi
Courbe standard

ÉQUIPEMENT ET MATÉRIEL NÉCESSAIRE (NON FOURNI)

	Nombre	Taille
Pipette automatique ou distributeur	1	4.0 ml
Pipette automatique ou distributeur	1	1.0 ml
Micropipettes à embout en plastique et à usage unique	1	200 µl
Tubes à centrifuger		10–12 ml

Pipettes Pasteur ou équivalent
Bain-marie à 37°C ± 0.5°C à circulation.
Chronomètre ou compte-minutes.
Centrifugeuse capable d'atteindre 1500 g ou équipement de filtration.
Photomètre réglé à 620 ± 5 nm.
Un agitateur à vortex.
De l'eau distillée.
De la soude (NaOH) : solution à 0.5 N (0.5 M).

PARAMÈTRES DE LA MÉTHODE

Volume de l'échantillon : 200 µl
Volume réactionnel final : 5,2 ml
Temps et température d'incubation : 15 min à 37°C
Si les échantillons présentent des activités alpha-amylase élevées, abaisser le temps d'incubation à 5 minutes et multiplier la valeur lue sur la courbe standard par 3 (trois)

CONSERVATION

Conserver la trousse dans un endroit sec et à température ambiante et constante. Après ouverture, maintenir les flacons bouchés, le dessiccateur étant placé à l'intérieur. La date de péremption figure sur l'étiquette extérieure.
N.B. Attention aux contaminations des échantillons, des comprimés et du matériel par la salive ou la sueur.

PROTOCOLE D'UTILISATION

Note : Ces instructions sont impératives, leur non respect invalide l'utilisation de la courbe étalon.

1. Distribuer 200 µl de l'échantillon dans des tubes à centrifuger de 10–12 ml.
2. Ajouter 4.0 ml d'eau distillée dans tous les tubes. Un témoin d'eau distillée de 4.2 ml devra suivre le même traitement que tous les autres tubes.
3. Préincuber les tubes 5 min à 37°C au bain-marie.
4. Ajouter un comprimé à chaque tube au moyen de pinces. Vortexer 10 secondes et replacer au bain-marie. Pour une série d'essais, ajouter le comprimé à des intervalles réguliers d'exactement 15 ou 20 secondes.
5. Incuber 15 minutes (précises) dans un bain-marie à circulation à 37°C ± 0.5°C.
6. Arrêter la réaction exactement 15 minutes après l'addition du comprimé par 1 ml de NaOH 0.5 N. Mélanger immédiatement au vortex.
7. Centrifuger à 1500 g, 5 minutes ou filtrer. Prélever le surnageant ou le filtrat et le placer dans une cuve optique.
8. Mesurer la D.O. de l'échantillon à 620 nm contre de l'eau distillée. Utiliser une cuve de 1 cm de trajet optique.
9. Soustraire la D.O. du témoin de celle de l'échantillon.
10. S'assurer que la courbe étalon correspond au lot utilisé. Le numéro du lot imprimé sur la courbe étalon doit correspondre à celui figurant sur l'étiquette du flacon. Lire directement l'activité amylase des échantillons en U/l sur la courbe étalon.

UTILISATION SOUS DIFFÉRENTES CONDITIONS

Activités alpha-amylase modérées

La composition du comprimé est étudiée pour couvrir la plus large échelle de valeurs d'activité alpha-amylase possible. Sans aucune modification, il est possible de déterminer des activités alpha-amylase allant de 35 U/l à 1000 U/l, à condition de disposer d'un photomètre capable de lire une D.O de 2.

Activités alpha-amylase élevées

Ne pas tenir compte d'une D.O. supérieure à 2.0. Certains photomètres sont d'ailleurs limités à une D.O. de 1.0 à 1,5. Quand la D.O. dépasse la capacité du photomètre, diluer 10 fois le surnageant dans de l'eau distillée. Multiplier la D.O. par 10, soustraire la valeur du témoin et lire l'amylasémie sur la courbe étalon.

Activités alpha-amylase très élevées

Dans le cas d'activités très élevées, l'échantillon dilué dans de l'eau distillée jusqu'à 5 fois. Au delà, pour des dilutions plus importantes, utiliser une solution de NaCl 0.9%. Sérum albumine bovine 0.2%, $CaCl_2$ 20 mM dans de l'eau distillée. Lire l'amylasémie sur la courbe étalon et multiplier la valeur par le facteur de dilution approprié.

CALIBRATION

En accord avec les recommandations de la «Commission des Unités en Enzymologie Clinique » de l'«International Union of Biochemistry», une unité (U) d'activité amylase est définie comme la quantité d'enzyme catalysant l'hydrolyse de 1 µmol de liaison glucidique par minute à 37°C. La courbe étalon incluse dans la trousse donne directement la correspondance de la D.O. en U/l. Pour convertir les U/l en µkat/l (1 µmol /s·l) diviser le résultat par 60.
Comme de nombreuses méthodes de détermination de l'activité de l'alpha-amylase utilisent différents substrats, il n'est pas possible de trouver une corrélation stricte entre les U/l et les autres unités (Street-close, Somogyi).
Cependant, une conversion approximative des U/l en d'autres unités est possible.
Pour convertir en unités Somogyi/100 ml : multiplier par 0.54.
Pour convertir en unités Street-Close/100 ml : multiplier par 0.164.

GARANTIE

Toute modification de ce protocole, non recommandée par Magle AB, peut affecter les résultats, auquel cas Magle AB décline toute responsabilité exprimée, implicite ou établie par la loi, y compris la responsabilité liée à la commercialisation du produit et à ses modalités d'utilisation.
Magle AB et ses distributeurs agréés ne pourront, dans une telle éventualité, être tenus pour responsables des dommages indirects ou consécutifs en résultant.

Révisé en décembre 2006

Instrucciones de uso

FINALIDAD

El Phadebas® Amylase Test es un método adecuado para el análisis cuantitativo de la α-amilasa en fluidos.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El substrato es un polímero de almidón, insoluble en agua, de eslabón cruzado, que porta un colorante azul. Se hidroliza mediante la α-amilasa dando lugar a fragmentos azules solubles en agua. La absorbancia de la solución azul es una función de la actividad de la α-amilasa en la muestra.

TOMA DE MUESTRAS Y MANIPULACIÓN

- Evite la contaminación con detergentes, que pueden alterar la actividad de la α-amilasa. Para ello, es preciso utilizar material de vidrio bien enjuagado o material de plástico desechable.
- Debe tenerse especial cuidado para evitar la contaminación con saliva o sudor, que contienen grandes cantidades de α-amilasa.
- Evite los anticoagulantes que ligan con iones de calcio (Ca^{2+}). No debe utilizarse citrato, fluoruros ni EDTA.
- Al analizar muestras muy turbias, mida la absorbancia con respecto a un blanco de muestra. La técnica para el blanco de muestra es la misma que para las muestras normales, salvo que la muestra se añade después de la adición de NaOH.
- La actividad de la α-amilasa en las muestras de suero es estable durante una semana a temperatura ambiente controlada, pero se recomienda refrigerar las muestras de suero a 2–8 °C. Para periodos más largos, la muestra debe ser congelada (–20 °C).
- Se recomienda determinar la α-amilasa en la orina el mismo día en que se ha tomado la muestra. Aunque la mayoría de muestras de orina son estables durante una semana a 2–8 °C, se han dado casos de deterioro. Es preciso evitar la recogida de orina de 24 horas.

MATERIAL SUMINISTRADO, CONTENIDO DEL KIT

Phadebas Amylase Test (50): un frasco de 50 comprimidos o Phadebas Amylase Test (500): cinco frascos de 100 comprimidos (cada comprimido contiene 45 mg de almidón azul)
Folleto descriptivo
Curva estándar

EQUIPO DE LABORATORIO Y MATERIAL NECESARIO (NO SUMINISTRADO)

	Cantidad	Tamaño
Pipeta automática o dosificador	1	4.0 ml
Pipeta automática o dosificador	1	1.0 ml
Micropipetas con puntas de plástico desechables	1 de cada	200 µl
Tubos de centrifugador de plástico		10–12 ml

Pipetas Pasteur o equivalentes
Baño maría a 37 °C ± 0.5 °C con una buena circulación
Cronómetro o reloj
Centrifugador capaz de generar 1500 g, o equipo de filtración
Fotómetro para medir a 620 nm ± 5 nm
Mezclador por vibración
Agua destilada
Solución de hidróxido sódico (NaOH), 0.5 M

PARÁMETROS DEL MÉTODO

Volumen de muestra: 200 µl
Volumen de la mezcla reactiva final: 5.2 ml.
Tiempo de incubación y temperatura: 15 minutos a 37 °C.
En el caso de muestras con actividades de α-amilasa elevadas, será necesario reducir el tiempo de incubación a 5 minutos y multiplicar la lectura de actividad de la curva estándar por 3 (tres).

DURACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Conserve en un lugar seco a temperatura ambiente controlada. Después de abrir, conserve los frascos cerrados, manteniendo el desecante. La fecha de caducidad aparece indicada en la etiqueta exterior.
Nota: No se deben contaminar las muestras, los comprimidos ni el equipo con saliva o sudor.

PROCEDIMIENTO

Nota: Es preciso tener en cuenta que deben seguirse estas instrucciones al pie de la letra ya que, en caso contrario, la curva estándar no será válida.

1. Pipetee 200 µl de muestra en tubos de centrifugador de 10–12 ml.
2. Añada 4.0 ml de agua destilada. Asimismo, debe hacerse un blanco con agua destilada de 4.2 ml y efectuar con él todo el procedimiento.
3. Preincube los tubos durante 5 minutos a 37 °C en un baño maría.
4. Añada un comprimido a cada tubo, con ayuda de unas pinzas. Agite con el vibrador inmediatamente durante 10 segundos y colóquelos de nuevo en el baño maría. Para realizar análisis en serie, añada los comprimidos a intervalos de 15 a 20 segundos exactamente.
5. Incube los tubos en baño maría con buena circulación a 37 °C ± 0.5 °C durante 15 minutos exactamente.
6. Detenga la reacción exactamente a los 15 minutos tras la adición del comprimido, añadiendo 1.0 ml de hidróxido sódico 0.5 M. Mezcle con vibrador inmediatamente.
7. Centrifugue a 1500 g durante 5 minutos o filtre. Pipetee el sobrante azul/filtrado a una cubeta.
8. Mida la absorbancia del sobrante/filtrado a 620 nm con respecto al agua destilada con una cubeta de 1 cm de paso de luz.
9. Reste el valor de la absorbancia del blanco del de la muestra.
10. Asegúrese de que la curva estándar usada tiene el mismo número de lote que el que aparece impreso en la etiqueta del vial. Lea la actividad de α-amilasa en U/l en la curva estándar, que da directamente la actividad de α-amilasa de las muestras.

INSTRUCCIONES PARA TÉCNICAS MODIFICADAS PARA DISTINTOS INTERVALOS

Actividades moderadas de α-amilasa.

Se ha estudiado la composición del comprimido y el procedimiento de prueba para cubrir el mayor intervalo posible de actividad de α-amilasa. Sin realizar ningún paso posterior, es posible medir actividades de α-amilasa desde 35 U/l hasta 1000 U/l, empleando un fotómetro que mida absorbancias de hasta 2.0.

Actividades altas de α-amilasa

No mida absorbancias por encima de 2.0. Algunos fotómetros no pueden medir con precisión absorbancias de 1.0–1.5. Cuando la absorbancia supera la capacidad de medida del fotómetro, diluya el sobrante 10 veces con agua destilada. Multiplique la absorbancia por 10, reste el valor del blanco y lea la actividad de amilasa en la curva estándar.

Actividades muy elevadas de α-amilasa

Si es necesario medir actividades muy altas, se pueden diluir las muestras 5 veces con agua destilada. Para diluciones mayores se utilizará agua destilada con NaCl al 0.9%, albúmina bovina (BSA) al 0.2% y $CaCl_2$, 20 mM. Lea la actividad en la curva estándar y multiplique el valor por el factor de dilución adecuado.

CALIBRACIÓN

De acuerdo con las recomendaciones de la comisión de unidades enzimáticas clínicas de la International Union of Biochemistry, una unidad (U) de actividad de amilasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 µmol de enlace glucosídico por minuto a 37 °C. Un microkatal (µkat o µmol/s) equivale a 1/60 de una U. Mediante la curva estándar que se incluye en el envase, se pueden pasar a U/l los valores de la absorbancia de las muestras de prueba.
Como los distintos métodos para la determinación de la actividad de α-amilasa emplean distintos substratos, no existe una correlación estricta con otras unidades y U/l. Sin embargo, se pueden efectuar conversiones aproximadas de U/l a otras unidades.
Para realizar la conversión a unidades Somigyi/100 ml: multiplique por 0.54. Para realizar la conversión a unidades Street-Close/100 ml: multiplique por 0.164.

GARANTÍA

Cualquier cambio o modificación en el procedimiento, en contra de la recomendación de Magle AB, puede afectar a los resultados, en cuyo caso Magle AB declina cualquier responsabilidad y garantía expresa, implícita o reglamentaria, incluida la garantía implícita sobre la comerciabilidad e idoneidad para su uso.
En tal caso, Magle AB y sus distribuidores autorizados no asumirán responsabilidad alguna por los daños y perjuicios indirectos o derivados.

Revisado en diciembre de 2006

Phadebas® Amylase Test

Directions for use
Gebrauchsinformation
Mode d'emploi
Instrucciones de uso

Lund, Sweden 2007
www.phadebas.com

magle
LIFE SCIENCES